

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 3日現在

機関番号：	15501
研究種目：	若手研究(B)
研究期間：	2011~2012
課題番号：	23791846
研究課題名（和文）	子宮筋腫の増殖とエストロゲンレセプター $\alpha$ 標的遺伝子のDNAメチル化異常
研究課題名（英文）	Proliferation of uterine leiomyoma and the involvement of aberrant DNA methylation in estrogen receptor alpha target genes
研究代表者	
	前川 亮 (MAEKAWA RYO)
	山口大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：	90598749

## 研究成果の概要（和文）：

子宮筋腫においてestrogen receptorの標的遺伝子でDNAメチル化異常および発現異常を呈する遺伝子について検討した。その結果、低メチル化・高発現異常を呈する4遺伝子、低メチル化・低発現異常を呈する1遺伝子を抽出した。更に、高メチル化・高発現異常を呈する6遺伝子と高メチル化・低発現異常を呈する11遺伝子を抽出した。これら遺伝子には腫瘍の発生、進展に関わる遺伝子が多数含まれており、estrogen依存性に発症する子宮筋腫の病因となっている可能性が高い。

## 研究成果の概要（英文）：

We investigated estrogen receptor alpha-target genes that showed aberrant DNA methylation and mRNA expression. As the results, we obtained four genes that showed hypomethylation and upregulation, one gene that showed hypomethylation and downregulation, six genes that showed hypermethylation and upregulation, and eleven genes that showed hypermethylation and downregulation. Because those genes included the genes involved in the tumor development and proliferation, those genes possibly contributes to the pathogenesis of uterine leiomyoma through aberrant DNA methylation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、産婦人科学

キーワード：子宮筋、DNAメチル化異常、mRNA発現異常、estrogen receptor、progesterone receptor

## 1. 研究開始当初の背景

子宮筋腫は成熟女性の20-70%が罹患しているとされ、最も発症頻度の高い腫瘍性疾患である。また子宮筋腫は重度の月経痛や貧血を引き起こし、性成熟期婦人のQOLの極度の低下を引き起こすだけでなく、不妊症の原因ともなりうる。また、子宮筋腫は初経後に発症することから、estrogen依存性に発症することが知られている。

子宮筋腫発症のリスク因子として、人種（アフリカ系）、高BMI、早期の初経開始、高血圧、肉食などが挙げられ、一方でリスクを下げる因子として、経口避妊薬の使用、喫煙、多産、菜食等が挙げられる。これらのことから、遺伝的背景（ジェネティック）だけではなく、後天的な要因であるホルモン環境、栄養、生活環境が大きく影響していることが予想される。つまり、エピジェネティックな影

響が関与している可能性がある。このエピジェネティクスは、DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子機能について研究する学問領域であり、DNA のメチル化とヒストン修飾が中心となる。ゲノム全域のエピジェネティクス情報はエピゲノムと呼ばれ、エピジェネティクス系の異常が糖尿病、自己免疫疾患、癌など、様々な異常の原因になっていることが明らかになりつつ有る。

当研究室はこれまでに子宮筋腫の発生・進展にエピゲノム異常が関与するという仮説のもと、子宮筋腫の DNA メチル化解析を行ってきた。その結果、子宮筋腫では正常筋層と比較してゲノムワイドに DNA メチル化異常が生じていることを RLGS (Restriction Landmark Genomic Scanning) 法を用いて明らかにした (Molecular Human Reproduction, 2009, 実験医学 28 巻 2537, 2010)。また、遺伝子同定が可能なゲノムワイド DNA メチル化解析法である D-REAM (microarray-based DNA methylation analysis with restriction tag-mediated amplification) 法を用いた解析も行い、正常筋層と比較して子宮筋腫でプロモーター領域に DNA メチル化異常を呈する 781 遺伝子を発見した (Journal of Reproduction and Development, 2011)。これらの遺伝子の中には、estrogen receptor の標的遺伝子が含まれていた。子宮筋腫は estrogen 依存性に発症することから、プロモーター領域の DNA メチル化異常が estrogen に対する反応性に関与するならば、この遺伝子の発現亢進/減弱が子宮筋腫の増殖に促進的に働いている可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、正常子宮筋層と比較して子宮筋腫においてプロモーター領域に DNA メチル化異常を有する遺伝子を抽出する。また、同時に発現異常についても検討を行い、DNA メチル化異常と発現異常の両者を呈する遺伝子を抽出する。そして、それら遺伝子の中で、プロモーター領域に estrogen receptor alpha の標的配列 (ERE: estrogen receptor response element) を有する遺伝子、即ち estrogen receptor の標的遺伝子を抽出する。

## 3. 研究の方法

子宮筋腫を有し、子宮摘出術を施行した 3 症例 (Case1 から Case3) から、それぞれ正常子宮筋層と子宮筋腫組織を採取し、それぞれ 20mg ずつを実験に供した。これら組織から Qiagen Genomic DNA (Qiagen 社) を用いて同キットのプロトコール通りに DNA を抽出し、Illumina HumanMethylation450 Bead

Chip (Illumina 社) にてゲノムワイド DNA メチル化解析を行った。Detection p value > 0.05 以上の CpG サイトを解析対象とし、Y 染色体上の CpG サイトは解析対象外とした。その結果、482005 の CpG サイトが解析対象となった。解析には beta value ( $\beta$  値) を用いた。これらの CpG サイトについて、同一症例において正常子宮筋層と子宮筋腫間で DNA のメチル化状態 ( $\beta$  値) を比較することによって、子宮筋腫で遺伝子プロモーター領域にメチル化異常を呈する遺伝子を 3 症例それぞれで抽出した。メチル化の差については、筋層と筋腫の  $\beta$  値の差が 0.3 以上の場合に差があると定義した。

次に、同一のサンプルから Ambion® WT Expression kit (Ambion 社) を用いて同キットのプロトコール通りに mRNA を抽出した。続いて、GeneChip® Human Gene 1.0ST Array (Affymetrix 社) を用いて発現解析を行った。同様に、正常子宮筋層と子宮筋腫の間で mRNA 発現異常を呈する遺伝子を 3 症例それぞれで抽出した。発現異常は子宮筋層と筋腫の発現量に 1.5 倍以上の差を認めたとときに差があると規定した。これらのデータを用いて、遺伝子のプロモーター領域に DNA メチル化異常を有し、かつ発現異常を有する遺伝子を抽出した。

続いて、それら遺伝子の中で遺伝子プロモーター領域に相当する、転写開始点上流 1000bp 以内に estrogen receptor alpha の結合配列 (ERE) を有する遺伝子を抽出した。ERE の配列検索は MAPPER database (<http://mapper.chip.org/>) を用いて行った。

## 4. 研究成果

ゲノムワイドメチル化解析により、各症例 (Case1 から Case3) において子宮筋腫で DNA 低メチル化異常を呈する 2386、1327、3078 遺伝子と、高メチル化異常を呈する 2390、1702、3567 遺伝子を抽出した (図 1 A)。これら遺伝子のうち、低メチル化異常を呈する遺伝子では 478 遺伝子が、また高メチル化異常を呈する遺伝子では 1014 遺伝子が症例間で共通していた。

更に、マイクロアレイを用いた発現解析により各症例において子宮筋腫で高発現異常を呈する 1139、1000、1401 遺伝子と、低発現異常を呈する 2173、1058、1197 遺伝子を抽出した (図 1 B)。これら遺伝子のうち、高発現異常を呈する遺伝子では 349 遺伝子が、低発現異常を呈する遺伝子では 576 遺伝子が症例間で共通していた。

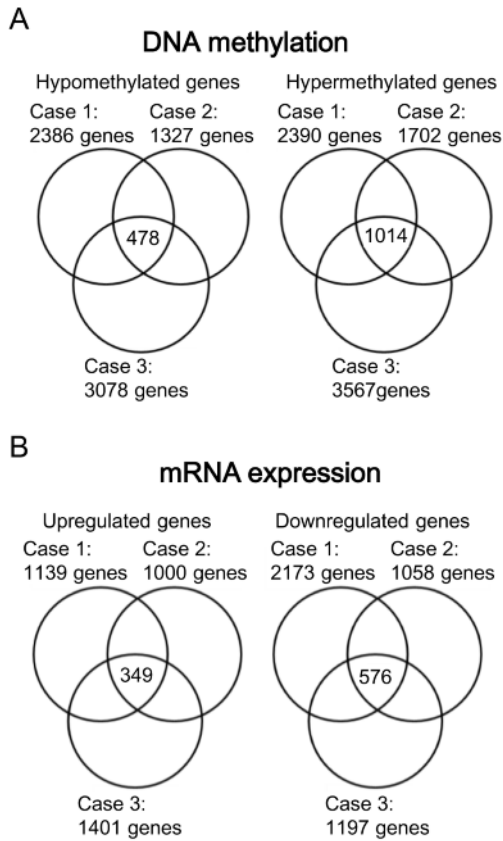


図1. ゲノムワイドDNAメチル化解析と発現解析. A: 各症例におけるDNAメチル化異常を呈する遺伝子数と症例間で共通した遺伝子数. B: 各症例におけるmRNA発現異常を呈する遺伝子数と症例間で共通した遺伝子数.

次に3症例間で共通したDNAメチル化異常遺伝子と発現異常遺伝子の中から、DNAメチル化異常と発現異常の両方を持つ遺伝子を抽出した。それら遺伝子のうち、遺伝子プロモーターに相当する転写開始点上流1000bp以内にEREを有する遺伝子を抽出した。その結果、低メチル化・高発現異常を呈する遺伝子ではCOL4A1、COL6A3、RPL39、ZMAT3の4遺伝子が転写開始点上流1000bp以内にEREを有していた。また低メチル化・低発現異常を呈する遺伝子ではOXTRがEREをプロモーター領域に有していた(表1)。COL4A1について症例数を追加してDNAメチル化状態とmRNA発現状態を検討したところ、1例を除いて全例で子宮筋腫がDNA低メチル化、mRNA高発現であった(図2AとB)。子宮筋腫はcollagenに富んだ強い弾性を呈する腫瘍である。Collagen遺伝子が低メチル化異常によるestrogen receptorに対する反応性の増加で発現が増加して子宮筋腫の形成に関わっている可能性が高い。一方、高メチル化・高発現異常を呈する遺伝子では、BCAN、KIF5C、NPTX2、TFAP2C、SCIN、THBS2の6遺伝子が、また高メチル化・低発現異常を呈する遺伝子

表1 DNAメチル化異常と発現異常を有するEstrogen receptor alphaの標的遺伝子

Gene		mRNA expression#
<b>Hypomethylated ERa target genes</b>		
COL4A1	collagen, type IV, alpha 1	↑
COL6A3	collagen, type VI, alpha 3	↑
RPL39	ribosomal protein L39	↑
ZMAT3	zinc finger, matrin-type 3	↓
OXTR	oxytocin receptor	↓
<b>Hypermethylated ERa target genes</b>		
BCAN	brevican	↑
KIF5C	kinesin family member 5C	↑
NPTX2	neuronal pentraxin II	↑
TFAP2C	transcription factor AP-2 gamma	↑
SCIN	scinderin	↑
THBS2	thrombospondin 2	↑
OCIAD2	OCIA domain containing 2	↓
CRHBP	corticotropin releasing hormone binding protein	↓
NUAK1	NUAK family, SNF1-like kinase, 1	↓
CCDC68	coiled-coil domain containing 68	↓
NR5A2	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	↓
ELTD1	EGF, latrophilin and seven transmembrane domain containing 1	↓
FAM162B	family with sequence similarity 162, member B	↓
IGF2BP3	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3	↓
DAPK1	death-associated protein kinase 1	↓
GSTM5	glutathione S-transferase mu 5	↓
EZR	ezrin	↓

# Microarray mRNA expression statuses of leiomyoma relative to corresponding myometrium are shown.

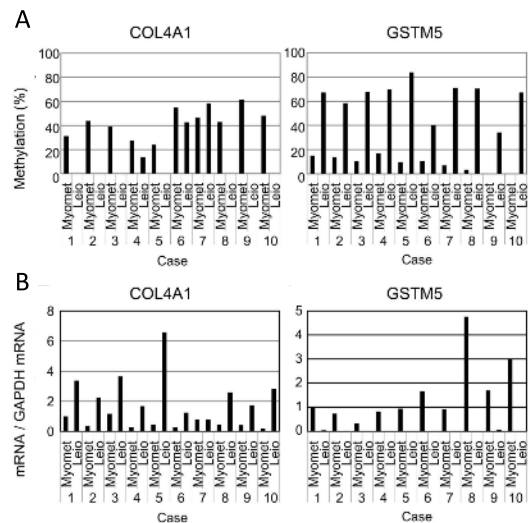


図2. A: COL4A1とGSTM5のDNAメチル化レベル。メチル化解析はcombined bisulfite restriction mapping (COBRA)法で行った。B: COL4A1とGSTM5のmRNA発現レベル。発現解析はquantitative real-time PCR法で行った。

ではOCIAD2、CRHBP、NUAK1、CCDC68、NR5A2、ELTD1、FAM162B、IGF2BP3、DAPK1、GSTM5、EZRの11遺伝子がEREをプロモーター領域に有していた(表1)。GSTM5について症例数を追加してDNAメチル化状態とmRNA発現状態を検討したところ、全例で子宮筋腫がDNA高

メチル化、mRNA 低発現を呈していた。GSTM5 は GST ファミリーの中の mu クラスに属しており、DNA をダメージから保護する機能を有している。これまでに、食道がんにおいて高メチル化と低発現が報告されており、がん化の非常に早期から出現していることが示されている。腫瘍の発症という点を考えると、非常に興味深い所見である。また、同様に GSTM5 の高メチル化、低発現は脳腫瘍、唾液腺がん、白血病で報告されている。また、NUAK1 と DAPK1 はがん抑制遺伝子として働くことが知られており、これらが高メチル化のため、estrogen receptor への反応性が低下することで、低発現異常を来し、筋腫の発症に関与している可能性がある。今回の検討において、子宮筋腫で DNA メチル化異常、mRNA 発現以上を呈していて、ERE を有する遺伝子には腫瘍の発生、進展に関わる遺伝子が含まれており、estrogen 依存性に発症する子宮筋腫の病因となっている可能性があると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計5件)

- ① 前川亮 佐藤俊 浅田裕美 山縣芳明 田村功 李理華 竹谷俊明 田村博史 杉野法広：子宮筋腫における DNA 低メチル化異常遺伝子の X 染色体への集積、第 16 回日本製色内分泌学会学術集会、(2012 年 11 月 19 日、東京都千代田区 シェーンバツハ・サボ一)
- ② 前川亮：子宮筋腫における DNA メチル化異常、第 3 回婦人科ホルモン依存性疾患研究会 (招待講演、2012 年 5 月 26 日、東京都港区 グランパシフィック LE DAIBA)
- ③ 前川亮 佐藤俊 山形芳明 浅田裕美 田村功 李理華 杉野法広：子宮筋腫における DNA 低メチル化異常遺伝子の X 染色体への集積、第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会 (2012 年 5 月 14 日、東京都千代田区 学術総合センター)
- ④ 前川亮 佐藤俊 山縣芳明 浅田裕美 山縣芳明 田村功 李理華 田邊学 田村博史 杉野法広：子宮筋腫のゲノムワイドメチル化解析、第 85 回日本内分泌学会 (2012 年 4 月 19 日、名古屋市 名古屋国際会議場)
- ⑤ 前川亮 山縣芳明 浅田裕美 田村功 李理華 杉野法広：子宮筋腫のゲノムワイド DNA メチル化解析、第 64 回日本産科婦人科学会学術講演会 (2012 年 4 月 13 日、神戸市 神戸ポートピアホテル)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前川 亮 (MAEKAWA RYO)

山口大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90598749